HTLV BLOT 2.4

TESTE WESTERN BLOT

CE
0123

DATA DE REVISÃO: 05/05
MAK 0011-BRA-0

Observação: alterações realçadas

REF (kit de 18 testes) : 11080-018
(kit de 36 testes) : 11080-036

NOME E APLICAÇÃO

O **BLOT HTLV 2.4 da MP Diagnostics (MPD)** é um teste imunoenzimático qualitativo para a detecção *in vitro* de anticorpos para HTLV-I e HTLV-II no soro ou plasma humano. Destina-se a ser usado como um teste complementar mais específico para amostras de soro ou plasma humano que apresentaram resultados repetidamente reativos por procedimentos de triagem ou rastreio, como os testes imunoenzimáticos ELISA.

INTRODUÇÃO

Estudos epidemiológicos recentes nos Estados Unidos e Europa confirmaram a ocorrência de prevalência mista de HTLV-I e HTLV-II em diferentes populações de alto risco, como em usuários de drogas intravenosas. Existem vários testes de triagem para HTLV-I/II disponíveis. As amostras repetidamente positivas nos testes de triagem exigem provas adicionais e mais específicas para confirmar a soropositividade para HTLV-I ou HTLV-II. Tais testes complementares devem ser capazes de identificar anticorpos contra proteínas centrais *(gag)* e do envelope *(env)* do HTLV-I e do HTLV-II. As fitas de Western Blot incorporadas com antígenos virais nativos de HTLV-I é um destes testes complementares largamente usados. No entanto, devido à ausência de antígenos de envelope nas provas clássicas de Western Blot para o HTLV-I, muitas vezes é necessário usar métodos de radioimunoprecipitação para confirmar a presença de anticorpos para HTLV-I/II. A discriminação quanto à soropositividade para HTLV-I e HTLV-II exige testes adicionais (i.e. peptídeos específicos, testes de ELISA e de PCR).

Por isso, são necessários testes sorológicos simples, porém específicos e sensíveis, que possibilitem uma confirmação rápida e a diferenciação entre amostras soropositivas para o HTLV-I e para o HTLV-II.

O **BLOT HTLV 2.4 da MP Diagnostics** apresenta sensibilidade e especificidade aprimoradas tanto para confirmar como para diferenciar as sororreatividades para HTLV-I e para HTLV-II. Isto é efetuado graças à incorporação de MTA-1, uma proteína recombinante exclusiva do envelope do HTLV-I (rgp46-I), de K55, uma proteína recombinante exclusiva do envelope de HTLV-II (rgp46-II), e de GD21, uma proteína recombinante de epitopo de envelopes, que embora comum ao HTLV-I e HTLV-II é específica. Cada fita inclui também um controle interno de adição de amostra para minimizar o risco de falso-negativos provocados por erros operacionais.

O **BLOT HTLV 2.4 da MP Diagnostics** foi concebido como um teste complementar para anticorpos, que pode caracterizar amostras repetidamente positivas nos testes de triagem iniciais para anticorpos contra HTLV-I/II. Os possíveis perfis sorológicos definidos pelo **BLOT HTLV 2.4 da MP Diagnostics** são: Soropositivo para HTLV, Soropositivo para HTLV-I, Soropositivo para HTLV-II, Soronegativo ou Indeterminado.

DESCRIÇÃO DOS SÍMBOLOS USADOS

Os símbolos gráficos usados ou encontrados nos produtos e embalagens **MP Diagnostics** estão indicados a seguir. Estes são os símbolos mais comuns presentes em dispositivos médicos e em suas respectivas embalagens e são explicados com mais detalhes no British and European Standard BS EN 980: 2003.

Usar até
Sinônimo:
Data de Validade

Dispositivo médico para diagnóstico in vitro

Código da Remessa
Sinônimos:
Número do Lote
Número da Remessa

Número de catálogo

Limites de Temperatura

Atenção.
Ver Instruções de Uso

Fabricante

Representante Autorizado na Comunidade Européia

Contém o suficiente para <n> testes

Consulte as instruções de uso

Não reutilize

PRINCÍPIOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS DO PROCEDIMENTO

As fitas de nitrocelulose são incorporadas com proteínas virais do HTLV-I derivadas de partículas virais rompidas nativas e inativadas e proteínas obtidas por engenharia genética. As fitas individuais de nitrocelulose são incubadas com amostras de soro ou plasma diluídos e com controles. Os anticorpos específicos contra o HTLV-I/II, caso presentes na amostra, irão se fixar às proteínas do HTLV-I/II nas fitas. As fitas são lavadas para remover o material não fixado; já os anticorpos que se fixam especificamente às proteínas do HTLV podem ser visualizados por uma série de reações mediante o uso de anticorpo caprino anti-IgG humana conjugado à fosfatase alcalina e do substrato BCIP/NBT. Este método é suficientemente sensível para detectar quantidades mínimas de anticorpos específicos contra o HTLV no soro ou plasma.

COMPONENTES DO KIT

	Descrição dos Componentes	Quantidade fornecida
ANTIGEN STRIPS	**FITAS DE NITROCELULOSE** Incorporado com HTLV-I lisado viral, antígenos de envelope recombinante, e um controle de adição de soro (o anti-humano IgG) banda. Mantenha secas e ao abrigo da luz.	Disponível em 18 e 36 fitas
CONTROL —	**CONTROLE NÃO-REATIVO** Soro humano normal inativado, não-reativo para HBsAg nem para anticorpos contra HCV, HIV-1/2 e HTLV-I/II. Contém azida sódica e tiomersal como conservantes.	1 frasco (80 µl)
CONTROL I +	**CONTROLE REATIVO FORTE I** Soro humano inativado contendo título elevado de anticorpos contra HTLV-I e nãoreativo para HBsAg nem para anticorpos contra HCV e HIV-1/2. Contém azida sódica e tiomersal como conservantes.	1 frasco (80 µl)
CONTROL II +	**CONTROLE REATIVO FORTE II** Soro humano inativado contendo título elevado de anticorpos contra HTLV-II e não-reativo para HBsAg nem para anticorpos contra HCV e HIV-1/2. Contém azida sódica e tiomersal como conservantes.	1 frasco (80 µl)
BUF LYO. STOCK	**SOLUÇÃO-TAMPÃO ESTOQUE LIOFILIZADA** A ser reconstituída em água de qualidade reagente. Solução-tampão Tris com proteínas de origem animal e não-animal inativadas pelo calor. Contém tiomersal como conservante.	1 ou 2 frascos (cada um a ser reconstituído para completar 100 ml)
BUF WASH 20x T	**SOLUÇÃO-TAMPÃO DE LAVAGEM CONCENTRADA (20x)** Tris com Tween-20; contém tiomersal como conservante.	1 frasco (70 ml)
CONJUGATE	**CONJUGADO** Anticorpo caprino anti-IgG humana conjugado à fosfatase alcalina.	1 frasco (120 µl)
SUBS BCIP / NBT ⚠	**SUBSTRATO** Solução de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- fosfato (BCIP) e azul de nitrotetrazólio (NBT).	1 frasco (100 ml)
POWDER BLOTTING	**PÓ PARA BLOTTING** Leite desnatado em pó	10 embalagens (1g cada)
	Bandejas de incubação, 9 poços cada	2 ou 4 bandejas
	Manual de Instruções	1 exemplar
	Pinça	1 peça

Nota: O volume de reagentes fornecido é suficiente para 4 processamentos.

AVISOS E PRECAUÇÕES

1. Para uso exclusivo em diagnóstico *in vitro.*
2. Exclusivamente para uso profissional.
3. Solicitamos consultar a documentação dos produtos para informações sobre componentes potencialmente perigosos.

INFORMAÇÕES DE SAÚDE E SEGURANÇA

CUIDADO: Este kit contém material de origem humana. Nenhum método de teste pode oferecer garantia total que os produtos de sangue humano não transmitirão infecções.

MANUSEIE AS AMOSTRAS ASSIM COMO OS CONTROLES REATIVO FORTE I, REATIVO FORTE II E OS CONTROLES NÃO-REATIVOS COMO AGENTES POTENCIALMENTE INFECCIOSOS. Recomenda-se manusear os componentes e as amostras do teste de acordo com as boas práticas de laboratório. O descarte deverá ser realizado de acordo com os procedimentos de segurança vigentes.

O ***Controle Reativo Forte I, Controle Reativo Forte II*** e o ***Controle Não-Reativo*** contêm tiomersal e azida sódica; já a Solução-Tampão Estoque Concentrada e a Solução-Tampão de Lavagem Concentrada contêm tiomersal e o Conjugado contém azida sódica. A azida sódica pode reagir com o cobre e o chumbo usados em alguns sistemas de canalização formando sais explosivos. Embora as quantidades usadas neste kit sejam pequenas, o descarte de materiais que contêm azida deve ser feito por lavagem com volumes relativamente altos de água de forma a evitar a formação de azida metálica no sistema de canalização. As frases de risco (R) pertinentes são:

R20/21/22 Prejudicial se inalado, em contato com pele e se ingerido.

O ***Substrato*** contém 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato e azul de nitrotetrazólio, classificado pelas Diretivas da Comunidade Econômica Européia (CEE) aplicáveis como nocivo (Xn). As frases de risco (R) pertinentes são:

R20/21/22 Nocivo por inalação, em contato com a pele e em caso de ingestão.

1. Evite a contaminação microbiana dos reagentes ao abrir e retirar alíquotas dos frascos originais.

2. Não pipete com a boca.

3. Manuseie as amostras de testes, as fitas de nitrocelulose e os Controles Reativos Forte I, Forte II e os Controles Não-Reativos como agentes potencialmente infecciosos.

4. Use vestuário de laboratório e luvas descartáveis durante a realização do teste. Descarte as luvas em sacos plásticos exclusivos para lixo biológico perigoso. A seguir, lave bem as mãos.

5. É altamente recomendável que este teste seja realizado em uma câmara adequada para material biológico perigoso.

6. Mantenha todo o material longe de alimentos e bebidas.

7. Em caso de acidente ou contato com os olhos, lave imediatamente com água em abundância e procure ajuda médica.

8. Consulte imediatamente um médico caso sejam ingeridos materiais contaminados ou haja contato destes com feridas abertas ou outros ferimentos.

9. Enxugue imediatamente derramamentos de materiais infecciosos com papel absorvente e limpe a área contaminada com solução de hipoclorito de sódio a 1% antes de continuar o trabalho. O hipoclorito de sódio não deve ser usado em derramamentos que contêm ácidos, a não ser que a área seja primeiro enxugada com papel absorvente. O material usado (incluindo as luvas descartáveis) deve ser descartado como sendo material biológico potencialmente perigoso. Não esterilize em autoclave material contendo hipoclorito de sódio.

10. Antes do descarte, esterilize em autoclave todo o material usado e contaminado a 121°C e 15 p.s.i. durante 30 minutos. Alternativamente, descontamine o material em solução de hipoclorito de sódio a 5% durante 30 a 60 minutos antes do descarte em sacos para lixo biológico perigoso.

11. Descontamine todos os produtos químicos e reagentes usados adicionando um volume suficiente de hipoclorito de sódio de forma a obter uma concentração final de pelo menos 1%. Deixe agir durante 30 minutos para garantir uma descontaminação eficiente.

12. Não é recomendável reutilizar as bandejas de incubação.

PRECAUÇÕES ANALÍTICAS

1. Para garantir um desempenho perfeito do teste é necessário **SEGUIR À RISCA** os procedimentos descritos neste Manual de Instruções. A inobservância desses procedimentos pode acarretar resultados anômalos.

2. **NÃO MODIFIQUE NEM SUBSTITUA REAGENTES DE UM LOTE DO KIT POR OUTRO.** Os controles, o conjugado e as fitas de Western Blot foram combinados entre si para oferecer o melhor desempenho. Use somente reagentes fornecidos com o kit.

3. Não use componentes do kit além da data de validade impressa na caixa do kit.

4. Evite a contaminação microbiana dos reagentes ao abrir e retirar alíquotas dos frascos originais pois a contaminação reduzirá prematuramente a vida útil dos kits e fornecerá resultados errôneos. Use técnicas assépticas como pipetas ou ponteiras de pipetas descartáveis para retirar alíquotas dos frascos.

5. Em cada processamento de amostras de pacientes, deve-se testar os controles do kit em paralelo.

6. Use uma ponteira de pipeta nova para cada alíquota de amostra, para evitar contaminação cruzada.

7. Para melhores resultados, aplique todos os reagentes enquanto ainda estiverem frios e retorne-os ao armazenamento entre 2°C e 8°C, o mais depressa possível.

8. Recomenda-se que a vidraria a ser usada com os reagentes seja lavada com ácido clorídrico 2M e enxaguada abundantemente com água destilada ou deionizada antes do uso.

9. Use somente água de qualidade reagente, deionizada ou destilada, para diluir os reagentes.

10. Todos os reagentes devem ser bem misturados antes do uso.

11. A solução de Conjugado de Trabalho, a Solução-Tampão de Lavagem Diluída e a Solução-Tampão para Blotting devem ser **preparadas logo antes do uso.**

12. A solução de Conjugado de Trabalho deve ser preparada usando um recipiente ou bécher de polipropileno.

13. Não exponha os reagentes nem realize testes em áreas contendo altos níveis de vapores de desinfetantes químicos (p. ex., vapores de hipoclorito) durante as etapas de armazenamento ou de incubação. O contato inibe a reação colorida. Da mesma forma, não exponha os reagentes à luz intensa.

14. O teste deve preferencialmente ser realizado à temperatura ambiente (25°C ± 3°C).

15. Certifique-se de que as fitas de teste estão dispostas com os números nas fitas voltados para cima.

16. Para a prova de Western Blot, é importante usar um agitador de plataforma oscilante e não um agitador rotativo. Caso contrário, o desempenho do kit estará comprometido. A velocidade e o ângulo de inclinação recomendados para o agitador são de 12 a 16 ciclos por minuto, e 5 a 10 graus, respectivamente.

17. Se usar equipamento automático, confira se está aferido antes do uso.

18. Certifique-se de que as amostras são adicionadas longe da fita. A bandeja pode ser inclinada e a amostra adicionada no local onde a solução-tampão é coletada na extremidade inferior. Isto evita a formação de manchas escuras devidas à adição de amostra na fita.

19. Evite o uso de congeladores de descongelamento automático *(frost free)* para armazenar reagentes e amostras.

INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO

1. Conserve o kit HTLV BLOT 2.4 MPD e seus componentes entre 2°C e 8°C quando não estiverem em uso.
2. Todos os reagentes e fitas do teste permanecem estáveis até a data de validade fornecida no kit, se conservados entre 2°C e 8°C. Não congele os reagentes.

A. **Fitas com antígenos**
   - Evite a exposição desnecessária das fitas com antígenos à luz.

B. **Reagentes**
   - Conserve os reagentes em seus recipientes originais, que devem ser fechados para armazenamento.
   - Aplique todos os reagentes enquanto estão ainda frios e retorne-os ao armazenamento entre 2°C e 8°C o mais depressa possível.
   - Quando o substrato for conservado entre 2°C e 8°C, poderá ocorrer formação de precipitados. Isto não irá afetar o desempenho do kit.

CUIDADO: Evite a exposição desnecessária do substrato à luz.

COLETA, TRANSPORTE E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

Podem ser usadas amostras de soro ou plasma coletadas em EDTA, heparina ou citrato de sódio. Antes do armazenamento, certifique-se que os coágulos sanguíneos ou as células sanguíneas foram separados por centrifugação.

As amostras devem ser conservadas entre 2°C e 8°C, se o teste for realizado no prazo de 7 dias após a coleta, ou congeladas à - 20°C ou menos, se o teste for adiado para mais de 7 dias após a coleta. É preferível usar amostras límpidas e não hemolisadas. Amostras extremamente lipêmicas, ictéricas ou contaminadas (partículas) devem ser filtradas (0,45 µm) ou centrifugadas antes do teste.

Os soros dos pacientes podem ser inativados, mas esta não é uma exigência para um desempenho ótimo do teste.

Inative da seguinte forma:
1. Afrouxe as tampas dos recipientes de soro.
2. Aqueça o soro a 56°C durante 30 minutos em banho-maria.
3. Deixe o soro esfriar antes de reapertar as tampas.
4. O soro pode ser mantido congelado até o momento da análise.

Recomendamos que os soros dos pacientes não sejam submetidos a múltiplos ciclos de congelamento e descongelamento antes das análises.

MATERIAIS ADICIONAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- Água deionizada ou destilada
- Luvas descartáveis
- Plataforma oscilante (com velocidade de agitação na faixa de 2 a 16 oscilações por minuto e com capacidade de inclinação entre 5° e 7°, para lavagem uniforme das membranas)
- Pipetadores e ponteiras de volumes adequados
- Sistema de aspiração e contenção em hipoclorito de sódio
- Banho-maria a 56°C (opcional)
- Hipoclorito de sódio para descontaminação

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

1. SOLUÇÃO-TAMPÃO DE LAVAGEM DILUÍDA

(a) A SOLUÇÃO-TAMPÃO DE LAVAGEM DILUÍDA deve ser **preparada logo antes do uso.**

(b) Dilua 1 volume de SOLUÇÃO-TAMPÃO DE LAVAGEM CONCENTRADA (20X) com 19 volumes de água de qualidade reagente. Misture bem.

2. SOLUÇÃO-TAMPÃO PARA BLOTTING

(a) Reconstitua cada frasco do TAMPÃO ESTOQUE LIOFILIZADO com 100 ml de água de qualidade reagente. Misture bem para dissolver. Esta SOLUÇÃO-TAMPÃO ESTOQUE RECONSTITUÍDA mantém-se estável durante 6 semanas se conservada entre 2°C e 8°C

(b) A SOLUÇÃO-TAMPÃO PARA BLOTTING **deve ser preparada logo antes do uso.** Adicione 1 g de PÓ PARA BLOTTING a cada 20 ml da SOLUÇÃO-TAMPÃO ESTOQUE RECONSTITUÍDA, preparada na etapa 2(a) acima. Agite para dissolver completamente o pó.

(c) Agite novamente antes de aplicar.

3. SOLUÇÃO DE CONJUGADO DE TRABALHO

Nota: Prepare a solução em um recipiente ou bécher de polipropileno.

(a) A SOLUÇÃO DE CONJUGADO DE TRABALHO **deve ser preparada logo antes do uso.**

(b) Prepare a SOLUÇÃO DE CONJUGADO DE TRABALHO diluindo o CONJUGADO a 1:1.000 em SOLUÇÃO-TAMPÃO PARA BLOTTING, por exemplo, 10 µl de CONJUGADO para 10 ml de SOLUÇÃO-TAMPÃO PARA BLOTTING.

4. SOLUÇÃO DE SUBSTRATO (pronta para uso)

(a) Distribua diretamente o volume necessário do frasco. Use uma pipeta limpa. Feche bem após o uso.

PROCEDIMENTO DO TESTE

Nota: a) Aspire todos os reagentes e produtos químicos usados para um recipiente de contenção com hipoclorito de sódio.

b) Todas as incubações devem ser realizadas em plataforma de agitação por oscilação.

Cuidado:

Algumas amostras provocam manchas escuras no ponto da fita em que são aplicadas. Para evitar este problema, proceda como indicado a seguir:

i. Aplique a amostra somente após a adição da SOLUÇÃO-TAMPÃO PARA BLOTTING.

ii. Incline a bandeja elevando ligeiramente sua extremidade superior ou inferior. A Solução-Tampão para Blotting irá fluir para a extremidade mais baixa da bandeja. Adicione a amostra onde a Solução-Tampão para Blotting é acumulada. Quando todas as amostras tiverem sido adicionadas, retorne a bandeja à posição horizontal original. Certifique-se de que as fitas mantenham-se sempre úmidas durante o procedimento.

iii. Alternativamente, caso não deseje inclinar a bandeja, as amostras podem ser adicionadas na extremidade superior ou inferior do poço. Desta forma, caso se desenvolvam manchas escuras, a leitura da fita não será afetada.

Procedimento:

1. Usando a pinça, retire cuidadosamente o número necessário de FITAS do tubo e coloque-as em cada poço com a face numerada voltada para cima. Inclua fitas para controles Reativo Forte, Reativo Fraco e Não-Reativo.

2. Adicione 2 ml de SOLUÇÃO-TAMPÃO DE LAVAGEM DILUÍDA a cada poço. **2 ml**

3. Incube as fitas durante pelo menos 5 minutos à temperatura ambiente (25 ±3°C) sobre uma plataforma oscilante (velocidade de 10 a 14 oscilações por minuto). Remova a solução-tampão por aspiração. **5 minutos**

4. Adicione 2 ml de SOLUÇÃO-TAMPÃO PARA BLOTTING a cada poço. **2 ml**

5. Adicione 20 µl de cada soro de paciente ou de controle nos poços apropriados. **20 µl**

6. Cubra a bandeja com a tampa fornecida e incube durante 1 hora à temperatura ambiente (25 ±3°C) na plataforma oscilante. **60 minutos**

7. Retire cuidadosamente a tampa, evitando salpicos ou misturar as amostras. Incline a bandeja para aspirar a mistura dos poços. Troque as ponteiras de aspiração entre as aplicações de amostras para evitar contaminação cruzada.

8. Lave cada fita 3 vezes com 2 ml de SOLUÇÃO-TAMPÃO DE LAVAGEM DILUÍDA deixando-as imersas durante 5 minutos sobre a plataforma oscilante entre cada lavagem. **3 x 2 ml**

9. Adicione 2 ml de SOLUÇÃO DE CONJUGADO DE TRABALHO a cada poço. **2 ml**

10. Cubra a bandeja e incube durante 1 hora à temperatura ambiente (25 ±3°C) na plataforma oscilante. **60 minutos**

11. Aspire o CONJUGADO dos poços. Lave como na etapa 8. **3 x 2 ml**

12. Adicione 2 ml de SOLUÇÃO DE SUBSTRATO a cada poço. **2 ml**

13. Cubra a bandeja e incube-a durante 15 minutos na plataforma oscilante. **15 minutos**

14. Aspire o SUBSTRATO e enxágüe as fitas pelo menos três vezes com água de qualidade reagente para interromper a reação. **3 x 2 ml**

15. Usando a pinça, retire cuidadosamente as fitas e coloque-as sobre toalhas de papel. Cubra com toalhas de papel e seque. Alternativamente, deixe as fitas secarem nos poços da bandeja.

16. Monte as fitas sobre folha de papel branco não absorvente. Não aplique fita adesiva sobre as bandas reveladas. Observe as bandas (Ver Interpretação dos Resultados) e interprete os resultados. Para armazenamento, conserve as fitas em local escuro.

RESUMO DOS PROTOCOLOS DO TESTE

Reagentes	Qtde	Duração
Fita de nitrocelulose	1	-
Solução-Tampão de Lavagem	2 ml	5 min
Solução-Tampão para Blotting	2 ml	-
Amostra	20 µl	60 min
Solução-Tampão de Lavagem	3 x 2 ml	3 x 5 min
Conjugado	2 ml	60 min
Solução-Tampão de Lavagem	3 x 2 ml	3 x 5 min
Substrato (pronto para uso)	2 ml	15 min
Água destilada	3 x 2 ml	-

QUANTIDADE NECESSÁRIA DE REAGENTES PARA VÁRIAS FITAS

Reagentes	NÚMERO DE FITAS A SEREM USADAS						
	3	6	9	15	20	27	36
Solução-Tampão de Lavagem 1X (ml)	60	100	140	240	300	400	520
Solução-Tampão para Blotting 1X (ml)	20	40	60	80	100	120	160
Conjugado (µl)	11	17	23	35	45	59	77
Substrato (ml)	11	17	23	35	45	59	77
Pó para Blotting (g)	1	2	3	4	5	6	8

CONTROLE DE QUALIDADE

Recomendamos processar os controles Não-Reativos e ambos os controles Reativos Fortes junto a cada teste, independentemente do número de amostras sob análise. Para que todos os resultados obtidos nos testes sejam considerados válidos, as condições a seguir deverão ser respeitadas:

1. **CONTROLE NÃO-REATIVO**
   Nenhuma banda específica do HTLV-I/II, rgp46-I, rgp46-II ou GD21 deverá ser exibida no controle Não-Reativo. A banda de controle de soro (anti-IgG humana) deve ser visível.

2. **CONTROLE REATIVO FORTE I**
   A banda de controle de soro e todas as bandas específicas do HTLV-I/II devem estar evidentes. As bandas importantes do HTLV-I obrigatoriamente presentes são: p19, p24, gp46, rgp46-I e GD21. Observe que a banda da gp46 é difusa.

3. **CONTROLE REATIVO FORTE II**
   A banda de controle de soro e todas as bandas específicas do HTLV-I/II devem estar evidentes. As bandas importantes do HTLV obrigatoriamente presentes são: p24, GD21 e rgp46-II.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

A banda de controle de soro serve como um controle da adição da amostra na prova. A ausência desta banda indica que não foi adicionado à fita nenhum soro de teste ou o conjugado ou o substrato, ou que ocorreram outros erros operacionais.

Localize e identifique as bandas nas fitas processadas com os controles Reativos Fortes. Estas fitas serão então usadas para identificar as bandas presentes na fitas que contêm as amostras sob teste.

PADRÃO	INTERPRETAÇÃO
1. Nenhuma reatividade com proteínas específicas do HTLV	SORONEGATIVO
2. Reatividade com moléculas codificadas pelo gene GAG (p19 com ou sem p24) <u>e</u> com duas codificadas por ENV (GD21 e rgp46-I)	SOROPOSITIVO PARA HTLV-I
3. Reatividade com moléculas codificadas por GAG (p24 com ou sem p19) <u>e</u> com duas por ENV (GD21 e rgp46-II)	SOROPOSITIVO PARA HTLV-II
4. Reatividade com moléculas codificadas por GAG (p19 e p24) <u>e</u> por ENV (GD21) - *<u>SOROPOSITIVO PARA HTLV-I</u> indicado se p19 ≥ p24* - *<u>SOROPOSITIVO PARA HTLV-II</u> indicado se p19 < p24*	SOROPOSITIVO PARA HTLV*
5. Detecção de bandas específicas para o HTLV, mas que não preenchem os critérios de soropositividade para HTLV-I, HTLV-II ou HTLV. *No entanto, os seguintes padrões de bandeamento classificados como indeterminados podem ser interpretados como SORONEGATIVOS:* - *Padrões de Western Blot com GAG do HTLV-I indeterminado (HGIP), exibindo presença de p19, p26, p28, p32, p36, p53 porém ausência de p24 e de quaisquer proteínas codificadas por ENV* - *Quaisquer combinações de proteínas codificadas por GAG (p19, p26, p28, p32, p36, p53) porém ausência de p24 e de quaisquer proteínas codificadas por ENV* - *Qualquer proteína de GAG sozinha (p19, p24, p26, p28, p32, p36, p53)*	INDETERMINADO**

* Amostras soropositivas para HTLV nas quais não é possível fazer a tipagem podem ser melhor solucionadas usando o algoritmo de *Wiktor et al* na ausência de rgp46-I e de rgp46-II. Este algoritmo usa a reatividade relativa de p19 e de p24 e mostrou-se eficiente para diferenciar os dois sorotipos.[7,11,12,13,14]

** A interpretação como indeterminado baseia-se nas diretrizes da OMS de 1990.[15] No entanto, vários estudos sugeriram que alguns padrões de bandas indeterminados (conforme indicado) podem ser interpretados como soronegativos, em especial quando provenientes de doadores de sangue sadios.[16-25] Por exemplo, um estudo envolvendo 37.724 doadores de sangue sadios confirmou que HGIPs podem ser interpretados com segurança como sendo soronegativos.[26] No entanto, deve-se ter cautela quando os padrões indeterminados forem obtidos de usuários de drogas intravenosas ou de doadores de sangue de áreas endêmicas, assim como de pacientes com doenças neurológicas.[26,27]

Embora sejam raras as amostras de soro de indivíduos com infecções duplas, elas podem existir e devem ser diferenciadas com base nos critérios acima indicados. Os padrões de bandas de tais amostras indicarão positividade para HTLV-I e para HTLV-II. Os dados disponíveis demonstram que as sororreatividades para rgp46-I e para 46-II são específicas para HTLV-I e HTLV-II, respectivamente. Portanto, as amostras de soro reativas para rgp46-I, rgp46-II, GD21, p19 e p24 determinam a presença de infecção dupla.

LIMITAÇÕES DO MÉTODO

Para garantir um desempenho perfeito do teste é necessário seguir à risca os procedimentos descritos. A inobservância desses procedimentos pode acarretar resultados anômalos.

Um resultado NEGATIVO não exclui a possibilidade de exposição a ou infecção por HTLV-I ou HTLV-II. Os blots INDETERMINADOS não deverão ser usados como base para o diagnóstico de infecção por HTLV-I/II.

Foi também registrada a reatividade para p19 assim como para p24 em populações não-infectadas e de baixo risco, embora os determinantes de p24 sejam relativamente raros.

A sensibilidade da rgp46-I registrada na França foi de 95%; na Jamaica e nos Estados Unidos, foi de 100% das amostras confirmadas por PCR e de 98% dos doadores de sangue positivos para HTLV-I. Foi observado que a sensibilidade da rgp46-II é maior que 98% em amostras dos Estados Unidos confirmadas por PCR.

Estima-se que a sensibilidade geral de cada especificidade de tipo, rgp46-I e rgp46-II, seja superior a 97%. A pequena porcentagem de amostras HTLV-I e HTLV-II que não reagem com rgp46-I nem com rgp46-II são capazes de reagir pelo menos com GD21 e com uma ou mais bandas GAG, p19 ou p24, preenchendo seja os critérios de soropositividade para HTLV (Padrão 4) ou de amostra com padrão Indeterminado (Padrão 5). Não foram relatados casos de interpretações falso-negativas.

Testes complementares como os de PCR (HTLV-I e HTLV-II) podem ser úteis para discriminar amostras soropositivas para o HTLV que não puderam ser identificadas como HTLV-I ou HTLV-II pelo BLOT HTLV 2.4 da MPD (p. ex. Padrão 4).

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO ESPECÍFICO

O desempenho do HTLV BLOT 2.4 MPD para a detecção de anticorpos para HTLV-I e HTLV-II foi avaliado usando HTLV-I/II soropositivo e amostras soronegativas e foi comparado com dois imunoensaios de linha incorporados com antígenos para HTLV I e HTLVII (proteínas recombinantes ou peptídios).

Sensibilidade

Amostras que são estabelecidas para serem positivas para anticorpos de HTLV I e / ou HTLV II por testes ELISAs comercialmente conhecidos foram usadas para determinar a sensibilidade do HTLV BLOT 2.4 MPD.

A. Comparação para Imunoensaio Linha 1
Resultado do Blot 2.4 comparando o HTLV BLOT 2.4 MPD e imunoensaios Linha 1 (LI 1) para amostras positivas compradas da Boston Biomedica, Inc., E.U.A. (BBI), e ProMedDx foram os seguintes:

Método		Imunoensaios Linha 1		Total
		NEG / IND	POS	
HTLV BLOT 2.4 MPD	NEG / IND	3*	0	3
	POS	0	102	102
	Total	3	102	105

* HTLV BLOT 2.4 MPD apresentou 2 resultados indeterminados e 1 resultado negativo que também foi detectado negativo com o imunoensaio Linha 1. Imunoensaios Linha 1 apresentou 3 resultados negativos.

Os dois Blots apresentaram as discriminações seguintes para 102 amostras positivas de HTLV:

Método	Interpretação				Total
	HTLV I	HTLV II	HTLV I & HTLV II **	Non-typeable ***	
HTLV BLOT 2.4 MPD	45	53	4	0	102
LI 1	48	51	0	3	102

** Ambos HTLV I e HTLV II marcadores específicos apareceram, indicando co-infecção.
*** Incapaz de detectar qualquer tipo de HTLV por causa da ausência de marcadores específicos.

Ambos HTLV BLOT 2.4 MPD e LI 1 apresentaram resultados semelhantes. Os poucos resultados discordantes apresentados foram devido ao uso de antígenos imobilizados diferentes nos blots e aos métodos diferentes usados.

HTLV BLOT 2.4 MPD apresentou uma sensibilidade de 97.1% que foi equivalente ao obtido com imunoensaio Linha 1.

B. Comparação para Imunoensaio Linha 2
A Sociedade Francesa de Transfusão de Sangue Anti-HTLV-I e II Painel de Desempenho , SFTS-94 que consistem em 26 HTLV-1 e 6 amostras de HTLV-II foram estudadas. Resultados do HTLV BLOT 2.4 MPD neste painel foram comparados com imunoensaio Linha 2 (LI 2) como segue:

Método	Interpretação				Total
	HTLV I	HTLV II	Non-typeable	Falso NEG	
HTLV BLOT 2.4 MPD	26	6	0	0	32
LI 2	21	6	4	1	32

HTLV BLOT 2.4 MPD identificou corretamente amostras positivas para HTLV, apresentando uma sensibilidade de >99.9% neste painel. Usando o mesmo painel, o kit (LI2) comparativo apresentou uma sensibilidade de 96.9%.

Especificidade

Um total de 200 amostras de doadores de sangue foram testadas resultando em uma especificidade de 92.5%. 15 amostras apresentaram resultados indeterminados e não houve nenhum resultado falso positivo.

Se 150 amostras clínicas, 50 amostras de gravidez, 50 amostras potencialmente indeterminadas (10 com ictericia, hemolizadas, triglicérides, lipêmica, amostras de proteínas totais), e 73 amostras apresentando potencialmente reação cruzada (TB, *Helicobactor pylori* , HEV, Dengue, HBV, HCV, HIV-1, HIV-2),são incluídas, a especificidade global foi 89.2% (461/517). 56 amostras apresentaram resultados indeterminados e não houve nenhum resultado falso positivo. 6 amostras foram verdadeiramente positivas confirmadas por outro teste confirmatório.

ISENÇÃO DE RESPONSABILIDADE EXPLÍCITA E LIMITADA

O fabricante não oferece nenhuma outra garantia expressa senão a de que o kit de teste funcionará como um teste para diagnóstico *in vitro* dentro das especificações e limitações descritas neste Manual de Instruções do produto quando usado em conformidade com as instruções nele contidas. O fabricante isenta-se de qualquer garantia, expressa ou implícita, incluindo as garantias expressas ou implícitas em relação à capacidade de comercialização, de utilização ou utilidade implícita para quaisquer outros fins. A responsabilidade do fabricante limita-se à substituição do produto ou ao reembolso do preço de compra do produto. O fabricante não será considerado responsável pelo comprador ou por terceiros por quaisquer danos, prejuízos ou perdas de caráter econômico que possam ser causados pelo uso ou aplicação do produto.

PROBLEMAS TÉCNICOS / RECLAMAÇÕES

Caso haja algum problema técnico ou reclamação, solicitamos proceder da seguinte forma:
1. Anote o número de lote do kit e a data de validade.
2. Conserve os kits e os resultados obtidos.
3. Contate o escritório MP Biomedicals mais próximo ou o seu distribuidor local.

REFERÊNCIAS

1. Towbin H., Staehlin T. and Gordan J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1976; 76: 4350-4354.

2. Poiesz BJ., Ruscetti FW., Gazdar AF., Bonn PA., Minna JD. And Gallo RC. Detection and Isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1980; 77(12): 7415-7419.

3. Kalyanaraman VS., Sarngadharan MG., Robert-Guroff M., Miyoshi I., Blayney D., Golde and Gallo RC. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. Science 1982; 218: 571-573.

4. William AE., Fang CT., Slamon DJ. et al. Seroprevalence and epidemiological correlates of HTLV-I infection in U.S. blood donors. Science 1988; 240: 643-646.

5. Lee H., Swanson P., Shorty VS., Zack JA., Roseblatt JD. and Chen ISY. High rate of HTLV-II infection in seropositive IV drug abusers in New Orleans. Science 1989; 244: 471-475.

6. Lipka JJ., Bui K., Reyes GR, Moeckli R., Wiktor SZ., Blattner WA., Murphy EL., Hanson CV., Shaw GM., Shinsky JJ. and Foung SKH. Determination of a unique immunodominant epitope of HTLV-I. Infect Dis 1990; 162: 353-357.

7. Wiktor SZ., Alexandra SS., Shaw GM. et al. Distinguishing between HTLV-I and HTLV-II by Western Blot. Lancet 1990; 335: 1533.

8. Samuel KP., Lautenberger JA., Jorcyk CL., Josephs S., Wong Staal F. and Papas TS. Diagnostic potential for human malignancies of bacterially produced HTLV-I envelope protein. Science 1984; 226: 1094-1097.

9. Hadlock KG., Goh CJ., Bradshaw PA., Perkins S., Lo J., Habbaz RK., Kaplan J. and Foung SKH. Delineation of an immunodominant and highly HTLV specific epitope within the HTLV-I transmembrane glycoprotein. Blood 1995; 68(4): 1392-1399.

10. Varma M., Rudolph D., Knuchel M., Switzer W., Hadlock KG., Velligan M., Chan L., Foung SKH., Lal RB. Enhanced specificity of truncated transmembrane protein for serologic confirmation of HTLV-I and HTLV-II infection by Western Blot assay containing recombinant envelope glycoproteins. J. Clin. Micro. 1995; 33(12): 3239-3244.

11. Lillehoj EP., Alexander SS., Dubrule CJ., Wiktor S., Adams R., Thi, A. Manns CC., and Blattner WA. Development and evaluation of a human T-Cell leukemia virus type I serologic confirmatory assay incorporating a recombinant envelope polypeptide. J. Clin. Microbiol. 1990; 28: 2653-2658.

12. Lal RB., Brodine SK., Coligan JE., and Roberts CR. Differential antibody responsiveness to p19 gag results in serological discrimination between human T-lymphotropic virus type I and type II. J. Med. Virol. 1991; 1: 232-236.

13. Hjelle B., Cyrus S., Swenson S., and Mills R. Serologic distinction between human T-lymphotropic virus (HTLV) type I and HTLV type II. Transfusion 1991; 31: 731-736.

14. Madeleine, MM., Wiktor SZ., Goedert JI., Manns A., Levine PH., Biggar RJ., Blattner WA. HTLV-I and HTLV-II worldwide distribution: reanalysis of 4.832 immunoblot results. Inte. J. Cancer 1993.; 54(2): 255-260.

15. World Health Organization's Global Programme on AIDS. WHO Global Programme on AIDS Information Update. Virus Information Exchange Newsletter 1990; 7(2): 54-55.

16. Lal, RB., Rudolph DL., Coligan JE., Brodine SK., and Roberts CR. Failure to detect evidence of human T-lymphotropic virus (HTLV) type I and type II in blood donors with isolated gag antibodies to HTLV-I/II. Blood 1992; 80: 544-550

17. Khabbaz, RF., Heneine W., Grindon A., Hartley TM., Shulman G., and Kaplan J. Indeterminate HTLV serologic results in U.S. blood donors: Are they due o HTLV-I or HTLV-II? J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 1992; 5: 400-404.

18. Lipka, JJ., Young KK., Kwok SY., Reyes GR., Sninsky JJ, and Foung SK. Significance of human T-lymphotropic virus type I indeterminant serological findings among healthy individuals. Vox Sang. 1991; 61: 171-176.

19. Zrein M., Louwagie J., Boeykens H., Govers L., Hendickx G., Bosman F., Sablon E., Demarquilly C., Boniface M., and Saman E. Assessment of a new immunoassay for serological confirmation and discrimination of human T-cell lymphotropic virus infections. Clin. Diag. Lab. Immunol. 1998; 5: 45-49.

20. Witt DJ., Kuramoto K., Kemper M., and Holland P. Utility of prospective study of donors deferred as HTLV indeterminate. Vox Sang. 2000; 78:130-131.

21. Hayes C.G., Burans JP., and Oberst RB. Antibodies to Human T Lymphotropic virus Type I in a population from the Philippines: Evidence for cross-reactivity with *Plasmodiun falciparum.* The J. Infect. Dis. 1990; 163: 257-262.

22. Gallo D., Diggs JL., and Hanson CV. Evaluation of two commercial Human T-Cell Lymphotropic Virus Western blot (Immunoblot) kits with problem specimens. J. Clin. Microbiol. 1994; 32: 2046-2049.

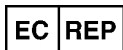
23. Garin B., Gosselin S., de The G., and Gessain A. HTLV-I/II infection in a high viral endemic area of Zaire, Central Africa: Comparative evaluation of serology, PCR, and significance of indeterminate Western blot pattern. J. Med. Virol. 1994; 44: 104-109.

24. Fujiyama C., Fujiyoshi T., Matsumoto D., Yashiki S., Tamashiro H., and Sonoda S. Re-evaluation of anti-HTLV-I Western blot assay using HTLV-I and HTLV-II serum panels. Clin. & Diag. Virol. 1995; 4: 149-161.

25. Rouet F., Meertens L., Courouble G., Herrmann-Storck C., Pabingui R., Chancerel B., Abid A., Strobel M., Mauclere P., and Gessain A. Serological, epidemiological, and molecular differences between human T-cell lymphotropic virus type I - seropositive healthy carriers and persons with HTLV-I gag indeterminate Western blot patterns from the Caribbean. J. Clin. Microbiol. 2001; 39: 1247-1253.

26. Cesaire R., Bera O., Maier H., Lezin A., Martial J., Ouka M., Kerob-Bauchet B., Ould Amar AK., and Vernant JC. Seroindeterminate patterns and seroconversions to human T-lymphotropic virus type I positivity in blood donors from Martinique, French West Indies. Transfusion 1999; 39: 1145-1149.

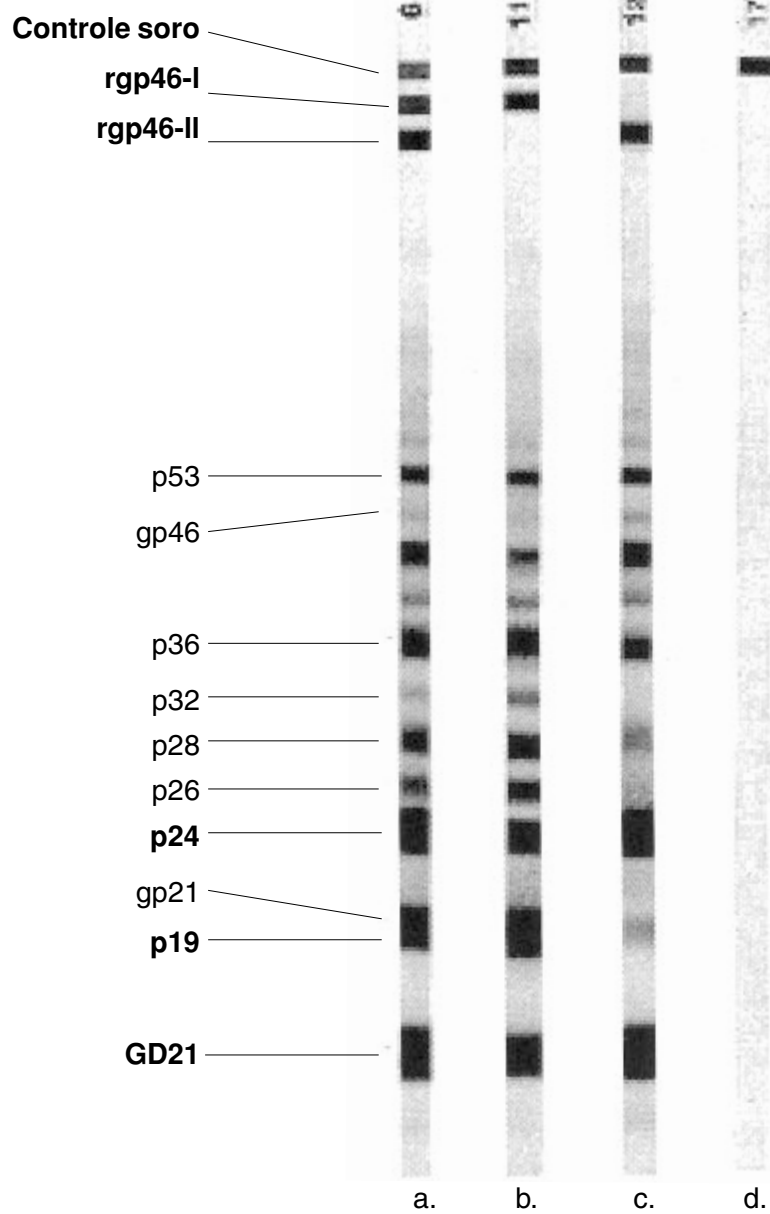
27. Soldan SS., Graf MD., Waziri A., Flerlage AN., Robinson SM., Kawaninshi T, Leist TP., Lehky TJ., Levin MC., and Jacobson S. HTLV-I/II seroindeterminate western blot reactivity in a cohort of patients with neurological disease. J. Infect. Dis. 1999; 180: 685-694.

MP Biomedicals Asia Pacific Pte Ltd.
85 Science Park Drive
#04-01, The Cavendish
Singapore Science Park
Cingapura 118259
Tel N°. : + 65 6775 0008
Fax N°. : + 65 6775 4536
E-mail : enquiry_ap@mpbio.com

Medical Technology Promedt
Consulting GmbH
Altenhofstrasse 80
D-66386 St. Ingbert
Alemanha
Tel N°. : + 49 68 94 58 1020
Fax N°. : + 49 68 94 58 1021
E-mail : info@mt-procons.com

Escritórios Regionais:

MP Biomedicals Suisse S.A.
Halle de Fret/Aeroport
P.O. Box 1015
1211 Genebra 5
Suíça
Tel N°. : (4122) 788-1908
Fax N°. : (4122) 788-1986
E-mail: mpbiosuisse@mpbio.com

* Patente nos EUA:	5.066.579; 5.614.366; 5.763.572; 5.814.441; 5.871.933; 5.643.714
* Patente australiana:	613350; 667189; 690540
* Patente canadense:	1337799
* Patente européia:	0395634
* Patente japonesa:	2559482

FIGURA 1

Bandas virais específicas conforme visualizadas com:

a. Um soro com infecção dupla por HTLV-I/II.
b. Controle Reativo Forte I. (Reativo unicamente para HTLV-I)
c. Controle Reativo Forte II. (Reativo unicamente para HTLV-II)
d. Controle Não Reativo.